

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

## CLAIMS

---

### [Claim(s)]

[Claim 1]The above-mentioned particles which are luminescent micro particles or a nano particle, contain photogene which has long luminescence damping time, and are characterized by intercepting this photogene chemically [ the circumference ] substantially from a biochemical parameter.

[Claim 2]The particle according to claim 1 with the one or more luminescent characteristics of said photogene chosen from a group which consists of a quantum yield, spectral characteristics, luminescence damping time, and anisotropy especially substantially unrelated to specific environment.

[Claim 3]The particles according to claim 1 or 2 in which said photogene is the metal / ligand complex of ruthenium (II) as a neutral atom, osmium (II), rhenium (I), iridium (III), platinum (II), and palladium (II).

[Claim 4]The particles according to claim 3 in which said photogene is complexes with a poly pyridyl ligand of two seats, such as a 2,2'-bipyridine as a ligand, BIPRAJIN, a phenanthroline, TAPIRJIRU, or those derivatives, or three seats.

[Claim 5]The particles according to claim 3 or 4 in which said luminescent compounds are the tris complexes of 2,2'-bipyridyl as a ligand, a 1,10-phenanthroline, 4,4-diphenyl-2,2'-bipyridyl and a 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline, and ruthenium (II).

[Claim 6]The particles according to claim 1 or 2 in which said photogene is the carbonyl complexes of another diimine ligands, such as a derivative of 2,2'-bipyridyl and a 1,10-phenanthroline, and Re(I).

[Claim 7]The particles according to claim 1 or 2 in which said luminescent compounds are the porphyrin complexes of Pt(II) as a neutral atom, and Pd(II).

[Claim 8]Particles given in any 1 paragraph containing organic polymer characterized by low absorptivity and/or low permeability of claims 1-7.

[Claim 9]The particles according to claim 8 containing organic polymer from a group which consists of polyacrylonitrile, a poly (meta) acrylic copolymer, polyvinyl chloride or polyvinylidene chlorides, and those copolymers.

[Claim 10]The particles according to claim 9 containing a copolymer of polyacrylonitrile or a polyacrylonitrile copolymer especially acrylic acid, acrylic amines, and/or acrylic ester.

[Claim 11]Particles given in any 1 paragraph of claims 1-7 containing glass with which micropore does not exist substantially.

[Claim 12]sol — the particles according to claim 11 containing glass manufactured in accordance with the /gel method.

[Claim 13]sol manufactured from silicon, titanium, a zirconium, and/or tintetraalcoholates — the particles according to claim 11 or 12 containing /gel glass.

[Claim 14]Particles given in any 1 paragraph of claims 1-13 with which the surface was embellished by reactant groups which make possible covalent bond coupling of a light instruction object and/or biomolecule, such as an amino group, an epoxy group, a hydroxyl group, a thiol group, and/or a carboxyl group.

[Claim 15]The particles according to claim 14 containing a light instruction object and/or biomolecule which carried out coupling to the surface in covalent bond.

[Claim 16]Although it is a manufacturing method of luminescent micro particles given in any 1 paragraph of claims 8-10, and a nano particle and is a polymer solvent and miscibility, A described method settling said particle by a fluid into which solubility of this polymer is reduced being dropped from a polymer solution in which said luminescent compound exists with a soluble gestalt.

[Claim 17]A method according to claim 15 of settling said particle from a solution which contains dimethylformamide and polyacrylonitrile, or a polyacrylonitrile copolymer in which said luminescent compound

exists with a soluble gestalt by water or solution being dropped.

[Claim 18]A method according to claim 16 or 17 of adjusting particle diameter of said particle by changing polymer content of said solution.

[Claim 19]A described method which is a manufacturing method of luminescent micro particles given in any 1 paragraph of claims 8-10, and a nano particle, and is characterized by building said luminescent compound into particles beforehand manufactured by diffusion from a solvent (mixture).

[Claim 20]A described method which is a manufacturing method of luminescent micro particles given in any 1 paragraph of claims 8-10, and a nano particle, sprays a polymer solution in which said luminescent compound exists said particle with a soluble gestalt, and is characterized by forming by evaporating a solvent.

[Claim 21]A method according to claim 20 of adjusting particle diameter of said particle by changing polymer content of a spray solution.

[Claim 22]it is a manufacturing method of luminescent micro particles given in any 1 paragraph of claims 11-13 - said luminescent compound — a compression monolithic — sol — a described method which includes in /gel glass, then grinds this glass, and is characterized by classifying according to a size.

[Claim 23]Use of luminescent micro particles given in any 1 paragraph of claims 1-14 in labeling of biomolecule from a group and luminescence detection which consist of a toxin, hormone, a hormone receptor, peptide, protein, lectin, an oligonucleotide, nucleic acid, an antibody, an antigen, a virus, and bacteria, and a nano particle.

[Claim 24]Use of luminescent micro particles given in any 1 paragraph of claims 1-14 as a reference standard of a fluorescence intensity signal in fluorescence assay, and a nano particle.

[Claim 25]The use according to claim 23 which changes strength data into a phase signal and/or a time-dependent parameter by adding said standard to a sample.

[Claim 26]The above-mentioned use which is use of luminescent micro particles given in any 1 paragraph of claims 1-14 for referring to a luminescence intensity signal of an optical luminescence sensor, and a nano particle, and is characterized by said particle being fixed by solid phase with a light instruction object.

[Claim 27]It is a light measuring method of biochemical or a chemical parameter using two kinds which have different damping time of different luminescent color matter, It is what obtains a reference parameter for said parameter measurement using time or a phase characteristic of a luminescence response acquired, The 1st luminescent color matter supports said parameter about luminescence intensity at least, A described method which the 2nd luminescent color matter does not correspond to said parameter about luminescence intensity and luminescence damping time at least, but is characterized by using the 2nd luminescent color matter for any 1 paragraph of claims 1-15 in a form of particles of a statement in that case.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2003-504506  
(P2003-504506A)

(43) 公表日 平成15年2月4日 (2003.2.4)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>         | 識別記号  | FI            | テーマコード (参考)       |
|-----------------------------------|-------|---------------|-------------------|
| C 0 9 K 11/06                     |       | C 0 9 K 11/06 | 4 D 0 7 6         |
| B 0 1 D 1/18                      |       | B 0 1 D 1/18  | 4 G 0 7 5         |
| 9/02                              | 6 0 1 | 9/02          | 6 0 1 L 4 H 0 5 0 |
|                                   | 6 0 2 |               | 6 0 2 E           |
|                                   | 6 0 4 |               | 6 0 4             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く |       |               |                   |

(21) 出願番号 特願2001-510815(P2001-510815)  
 (86) (22) 出願日 平成12年7月17日 (2000.7.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年1月11日 (2002.1.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP 00/06832  
 (87) 国際公開番号 WO 01/006227  
 (87) 国際公開日 平成13年1月25日 (2001.1.25)  
 (31) 優先権主張番号 199 33 104.9  
 (32) 優先日 平成11年7月15日 (1999.7.15)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 プレセンス プレジジョン センシング  
 ゲーエムベーハー  
 ドイツ連邦共和国 ディー-86633 ニュ  
 ーベルグ エー. ディー. ドナウ, シュ  
 ピタルプラッツ シー 191  
 (72) 発明者 クリマント, インゴ  
 ドイツ連邦共和国 ディー-93051 レジ  
 エンスブルグ フリードリッヒ-エベルト  
 -シュトラッセ 32  
 (74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)  
 Fターム(参考) 4D076 AA14 AA24 BA23 HA20 JA02  
 4G075 AA27 BB02 BB10 BD13 CA51  
 4H050 AA03 AB92 WB14 WB21

(54) 【発明の名称】 発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の製造および使用

## (57) 【要約】

本発明は、発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の組成物、製造および使用に関する。前記粒子は、蛍光シグナルを参照するための内部標準として、あるいは生体分子の標識および検出用のマーカーとして用いることができる。発光色素を固体材料に不活性形態で組み込んで、該色素を水系サンプル構成成分中の化学的および生物学的化合物の影響から保護するようにする。この組み込み型では、色素の光物理学的特性（スペクトル特性、発光量子効率、発光減衰時間および偏光）が、変動するサンプルパラメータによって影響されない。組み込み用基材としては、特に、その構造ゆえに、生体分子、小さい中性分子、さらにはイオン性化合物を取り込まない密な無機材料または有機ポリマーが選択される。特に、この方法では、発光測定値に対する分子状酸素（有効な消光剤）の干渉性の影響が排除される。前記ナノ粒子およびマイクロ粒子の表面に反応性表面を設けることで、生体分子の共有結合的カップリングを可能とすることができ、また、前記粒子の凝集を回避することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 発光性マイクロ粒子またはナノ粒子であって、長い発光減衰時間を有する発光物質を含有し、該発光物質が周囲の化学的および生化学的パラメータから実質的に遮断されていることを特徴とする、上記粒子。

【請求項2】 特に量子収率、スペクトル特性、発光減衰時間および異方性からなる群から選択される前記発光物質の1以上の発光特性が、特定の環境とは実質的に無関係である、請求項1に記載の粒子。

【請求項3】 前記発光物質が、中心原子としてのルテニウム (I I)、オスミウム (I I)、レニウム (I)、イリジウム (I I I)、白金 (I I) およびパラジウム (I I) の金属/配位子錯体である、請求項1または2に記載の粒子。

【請求項4】 前記発光物質が、配位子としての2, 2'-ビピリジン、ビピラジン、フェナントロリン、ターピリジルまたはそれらの誘導体などの2座または3座のポリピリジル配位子との錯体である、請求項3に記載の粒子。

【請求項5】 前記発光性化合物が、配位子としての2, 2'-ビピリジル、1, 10-フェナントロリン、4, 4'-ジフェニル-2, 2'-ビピリジルおよび4, 7'-ジフェニル-1, 10-フェナントロリンとルテニウム (I I) とのトリス錯体である、請求項3または4に記載の粒子。

【請求項6】 前記発光物質が、2, 2'-ビピリジルおよび1, 10-フェナントロリンの誘導体などの別のジイミン配位子とRe (I) とのカルボニル錯体である、請求項1または2に記載の粒子。

【請求項7】 前記発光性化合物が、中心原子としてのPt (I I) およびPd (I I) のポルフィリン錯体である、請求項1または2に記載の粒子。

【請求項8】 低い吸水性および/または低い気体透過性を特徴とする有機ポリマーを含有する、請求項1~7のいずれか1項に記載の粒子。

【請求項9】 ポリアクリロニトリル、ポリ(メタ)アクリル共重合体、ポリ塩化ビニルまたはポリ塩化ビニリデンおよびそれらの共重合体からなる群からの有機ポリマーを含む、請求項8に記載の粒子。

【請求項10】 ポリアクリロニトリルまたはポリアクリロニトリル共重合

(3)

特表2003-504506

体、特にアクリル酸、アクリルアミン類および／またはアクリル酸エステル類との共重合体を含む、請求項9に記載の粒子。

【請求項11】 実質的に微細孔が存在しないガラスを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の粒子。

【請求項12】 ゼル／ゲル法に従って製造されたガラスを含む、請求項11に記載の粒子。

【請求項13】 ケイ素、チタン、ジルコニウムおよび／またはスズテトラアルコラート類から製造されたゼル／ゲルガラスを含む、請求項11または12に記載の粒子。

【請求項14】 発光指示体および／または生体分子の共有結合的カップリングを可能とするアミノ基、エポキシ基、水酸基、チオール基および／またはカルボキシル基などの反応性基によって表面が修飾された、請求項1～13のいずれか1項に記載の粒子。

【請求項15】 表面に共有結合的にカップリングした発光指示体および／または生体分子を含む、請求項14に記載の粒子。

【請求項16】 請求項8～10のいずれか1項に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の製造方法であって、ポリマー溶媒と混和性であるが、該ポリマーの溶解度を低下させる液体を滴下することで、前記発光性化合物が可溶性形態で存在するポリマー溶液から前記粒子を沈殿させることを特徴とする、上記方法。

【請求項17】 水または水溶液を滴下することで、前記発光性化合物が可溶性形態で存在するジメチルホルムアミドおよびポリアクリロニトリルまたはポリアクリロニトリル共重合体を含む溶液から前記粒子を沈殿させる、請求項15に記載の方法。

【請求項18】 前記粒子の粒径を、前記溶液のポリマー含有量を変化させることで調節する、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】 請求項8～10のいずれか1項に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の製造方法であって、前記発光性化合物を、溶媒（混合物）からの拡散によって、前もって製造した粒子に組み込むことを特徴とする、上記方法。

(4)

特表2003-504506

。

【請求項20】 請求項8～10のいずれか1項に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の製造方法であって、前記粒子を、前記発光性化合物が可溶性形態で存在するポリマー溶液を噴霧し、溶媒を蒸発させることによって形成することを特徴とする、上記方法。

【請求項21】 前記粒子の粒径を、噴霧溶液のポリマー含有量を変化させることで調節する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 請求項11～13のいずれか1項に記載の発光性マイクロ粒子の製造方法であって、前記発光性化合物を圧縮モノリシックゾル／ゲルガラスに組み込み、次に該ガラスを粉砕し、大きさに応じて分別することを特徴とする、上記方法。

【請求項23】 毒素、ホルモン、ホルモン受容体、ペプチド、蛋白、レクチン、オリゴヌクレオチド、核酸、抗体、抗原、ウイルスおよび細菌からなる群からの生体分子の標識付けおよび発光検出における請求項1～14のいずれか1項に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の使用。

【請求項24】 蛍光アッセイでの蛍光強度シグナルの参照標準としての請求項1～14のいずれか1項に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の使用。

【請求項25】 サンプルに前記標準を加えることで、強度データを位相シグナルおよび／または時間依存的パラメータに変換する、請求項23に記載の使用。

【請求項26】 光学発光センサーの発光強度シグナルを参照するための請求項1～14のいずれか1項に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の使用であって、前記粒子が発光指示体とともに固相に固定化されていることを特徴とする、上記使用。

【請求項27】 異なる減衰時間を有する2種類の異なる発光色素を用いる生化学的または化学的パラメータの発光測定方法であって、得られる発光応答の時間または位相特性を用いて前記パラメータ測定のための参照パラメータを得るものであり、第1の発光色素が少なくとも発光強度に関して前記パラメータに対応しており、第2の発光色素が少なくとも発光強度および発光減衰時間に関して

(5)

特表2003-504506

前記パラメータに対応しておらず、その際、第2の発光色素が請求項1～15のいずれか1項に記載の粒子の形で用いられることを特徴とする、上記方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、長寿命の発光を有する発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の組成物、製造および使用に関する。その粒子は、蛍光もしくはリン光シグナル（発光シグナル）を参照するための内部標準として、あるいは生体分子の標識および検出用のマーカーとして用いることができる。長寿命発光色素は固体材料中に不活性形態で組み込まれる。すなわち、気体および液体サンプル中の化学物質および生体物質の影響から遮断される。この組み込み型では、色素の光物理学的特性（スペクトル特性、発光減衰時間および発光異方性）がサンプルパラメータを変えても影響されない。

## 【0002】

選択される組み込み用基材は特に、その構造ゆえに、生体分子、小さい中性分子、さらにはイオン性物質の取り込みを排除する、密な無機材料または有機ポリマーである。詳細には、この方法では、発光測定値に対する分子状酸素（有効な蛍光もしくはリン光消光剤）の干渉性の影響が排除されるか、または大幅に低減される。前記ナノ粒子およびマイクロ粒子の表面に反応性化学基を設けて、生体分子および／または発光指示色素の共有結合的カップリングを可能とすることができる。さらに、その表面に化学基を設けて、粒子が凝集するのを防止することができる。

## 【0003】

発光測定は、生物学的分析および化学分析において極めて一般的な方法である。その魅力は、高感度、多用途性、さらに放射性標識試薬による放射線被曝の排除によるものである。実際には、高量子収率を特徴とする発光マーカーが通常用いられる。ほとんどの場合、発光マーカーの発光強度は、測定されるサンプルパラメータと相関している。そうした測定方法は、多数の因子が発光強度の量的評価を妨害するという事実により悪影響を受ける。前記因子には第一に、光学系における変動（光源の照射強度、検出器感度および光路の透過率）があるが、サンプルに固有の光学特性（着色または濁り）も含まれる。

## 【0004】



(7)

特表2003-504506

前記干渉作用を排除もしくは低減するには、発光シグナルを参照するための好適な方法が必要である。WO 99/06821号に (Klimant) には、発光シグナルを参照する方法であって、実際の発光マーカースと同様の（良くて同一の）スペクトル特性を有する発光参照色素をサンプルに加えるという操作に基づいた方法が記載されている。この方法では、頻度調節したまたは時間分解した発光測定と併用して、強度データを位相シグナルまたは時間依存的パラメータに変換する。この方法において測定シグナルの正確な参照を行うには、発光特性がサンプルパラメータによって悪影響を受けない不活性な発光参照標準が必要である。この目的に適したものとしては、例えば、サンプルに粉末の形で混合しうる Cr (III) ドープ混合酸化物などのリン光性無機固体がある。他方、この目的には、有機もしくは無機材料製の担体に長寿命発光色素を組み込み、それとサンプルとを混合することも可能である。

## 【0005】

蛍光強度シグナルの量的評価に対する別の種類の干渉は、サンプルに固有の蛍光の発生である。特に血液または血清などの天然サンプルは多数の蛍光物質を含むことがある。蛍光アッセイのシグナル強度が非常に低い場合、固有の蛍光によって測定が不可能になることさえある。非特異的なバックグラウンドシグナルから実際の発光シグナルを取り出すための汎用方法は、マーカースとして長寿命の発光を有する発光色素を用いることである。時間分解発光法を併用すると、短寿命のバックグラウンド蛍光から遅延された測定シグナルを時間ごとに分離することができる。この方法は主として、希土類金属のリン光性キレート（特に、ユーロピウムまたはテルビウムのもの）を用いる。しかしながら、前記色素はUV光源によってのみ励起可能であるという欠点を有する。さらにそのキレートは、水系において可溶性形態で用いると、不安定である場合が多い。すなわち配位子が失われる。しかしながら、発光性金属／配位子錯体、特に中心原子としてルテニウム (II) を有するものも、好適な長寿命マーカースであり得る。これらの色素を水系に可溶性形態で加えると、それらの発光は通常、分子状酸素、強力な酸化剤または還元剤によって消光される。

## 【0006】

さらに、例えばpH、イオンもしくは小分子の濃度または活性を測定する場合、発光強度が、測定対象パラメータとの直接もしくは間接の相互作用のため、例えば分析物との反応、または変換器によって、測定対象パラメータ（例えば分析物の濃度または活性またはpH）に依存する発光指示体を用いることも可能である。

#### 【0007】

上記のいずれの方法においても、発光色素の光物理学的特性がサンプルパラメータによって影響されないことが必要とされる。これらの前提条件は、そのような色素を溶解した形でサンプルに加える場合や、その色素をサンプルと少なくとも間接的に接触させる場合には満足されない。分子状酸素ならびに酸化性および還元性消光剤による蛍光またはリン光の消光のために、測定シグナルの解釈を誤ることになる。

#### 【0008】

発光指示体の発光強度を参照するのに使用可能な不活性な長寿命発光性マーカーおよび発光性色素を得るには、発光色素を固体材料に組み込んで、それがサンプルと相互作用できないようにする必要がある。

#### 【0009】

本願は、発光特性がサンプル組成に依存したとしても無視できる程度である新規な発光性のマイクロ粒子およびナノ粒子の両方、ならびにそれらの製造方法について記載するものである。さらに、発光指示体の発光強度を参照する上での、ナノ粒子およびマイクロ粒子の形で存在する発光マーカーまたは発光性色素の可能な応用についても記載するものである。

#### 【0010】

従って本願は、例えばサンプルなどの環境化学パラメータから遮断されるように固体基材中で長期発光減衰時間を有し、量子収率、スペクトル特性、発光減衰時間および／または異方性などの発光特性が例えば個々のサンプル組成などの特定の環境から本質的に独立である、例えば金属／配位子錯体などの発光物質を含む発光性の、特にリン光性のマイクロ粒子およびナノ粒子に関するものである。

#### 【0011】

(9)

特表2003-504506

本願において「独立」とは、本発明の粒子中に存在し、サンプルと少なくとも間接的に接触する発光色素の環境中の  $pO_2$  および適宜他の干渉物質に対する発光減衰時間および適宜別の発光特性の依存性が、本発明の遮断を行わない場合におけるサンプルと少なくとも間接的に接触する相当する色素の発光減衰時間および適宜別の発光特性の依存性より低いことを意味している。

## 【0012】

好ましくは、本発明の粒子中に存在する発光色素の発光寿命は、室温において、 $O_2$  を含まない環境の場合より、空気飽和環境で多くとも20%、特に好ましくは多くとも15%、最も好ましくは多くとも10%短い。しかしながら遮断を行わないと、 $O_2$  を含まない環境と比較して空気飽和環境では、明らかに80%を超える発光減衰時間短縮が認められる。

## 【0013】

前記発光性金属／配位子錯体は好ましくは、中心金属としてルテニウム (II)、オスミウム (II)、レニウム (I)、イリジウム (III)、白金 (II) およびパラジウム (II) などの遷移金属を有する化合物である。錯体配位子は好ましくは、N-複素環を有する2座および／または3座の配位子、例えば2, 2'-ビピリジン、ビピラジン、フェナントロリン、ターピリジルまたはそれらの誘導体などのポリピリジル配位子から選択される。金属／配位子錯体の特に好ましい例としては、配位子として2, 2'-ビピリジル、1, 10-フェナントロリン、4, 4'-ジフェニル-2, 2'-ビピリジルおよび4, 7-ジフェニル-1, 10-フェナントロリンをもつルテニウム (II) のトリス錯体である。特に好ましいものは、例えば2, 2'-ビピリジルおよび1, 10-フェナントロリンなどのさらに別のポリ-N-複素環配位子とRe (I) のカルボニル錯体である。同様に、好ましい金属／配位子錯体は、室温での強力なリン光を特徴とする中心原子としてPt (II) またはPd (II) をもつポルフィリン錯体である。前記化合物の発光減衰時間は、好ましくは $\geq 100$ ナノ秒、特に好ましくは $\geq 400$ ナノ秒である。本発明によれば、例えばランタニドであるTb (III) およびEu (III) などの希土類金属その他の物質を、長寿命発光色素として用いることも可能である。

## 【0014】

発光性のミクロ粒子およびナノ粒子の平均粒径は、好ましくは20 nm～10  $\mu$ m、特に好ましくは50 nm～1  $\mu$ mの範囲である。発光性化合物は、水、消光性の気体物質（例：O<sub>2</sub>）および干渉物質の透過率が低い（すなわち、拡散定数が低く、溶解度が低い）ことを特徴とする材料に組み込む。好適な材料の例としては、非多孔質ガラス、特に例えばケイ素、チタン、ジルコニウムまたはスズを含む化合物、例えばスズテトラアルコラート類などのアルコラート類からゾル／ゲル法によって製造されたガラスがある。

## 【0015】

標準的な方法によってそのようなガラスを製造すると、微細孔構造を特徴とする材料となってしまう。そうすると、組み込まれた発光色素は溶存サンプル成分および特に酸素と接触し、それによって消光され得る。そのため、本発明に記載のゾルガラスは、特定の製造段階において、例えば200℃という高温で加熱することで圧縮させる。例えばテトラメトキシシランなどのゾル／ゲル前駆物質を加水分解した後、溶媒を減圧下に留去し、ゾル／ゲルを乾燥させてから、最終的な架橋を行う。このようにして、高密度の非多孔性ガラス基材が形成される。生体分子、さらには化合物もその高密度基材を透過できないことから、組み込まれた色素の発光特性に影響しない。ルテニウム（II）ートリスー1，10-フェナントロリン色素およびルテニウム（II）ートリスー4，7-ジフェニルー1，10-フェナントロリン色素を有し、40 mM（SiO<sub>2</sub>のkg基準）以下という色素含有量の不活性リン光性ゾル／ゲルガラスを、この方法に従って製造した。これらの材料は、酸素によって消光されない室温での強い発光を特徴とする。ゾル／ゲルリン光体はこの製造方法では、モノリシック型であるいは薄膜として形成されることから、粉碎によってミクロ粒子を製造しなければならない。その後、粒子をシラン処理することで、発光性の指示体または生体分子の共有結合カップリングに利用可能な反応性表面が得られる。その場合、粒子表面には、例えばアミノ基、エポキシ基、水酸基、チオール基および／またはカルボキシル基を設けることができる。

## 【0016】

不活性発光性粒子の別途製造方法は、第1に非常に低い気体透過率（酸素を排除するため）および第2に最小の水分吸収率（イオン性化合物の透過を防止するため）を特徴とする有機ポリマーを包埋用基材として使用するものである。好適なポリマーには、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ（メタ）アクリル酸ポリマー類および特にポリアクリロニトリルならびにそれらの共重合体がある。

#### 【0017】

ポリアクリロニトリル（PAN）は、極めて低い気体透過率、部分的親水性および非常に低い水吸収能力（約2%）を有する。さらに、例えばそのポリマー粒子の表面にあるニトリル基をケン化してカルボキシル基および／またはアミド基を得るかあるいは変換を行ってアミン基を得た後、それを各種生体分子の共有結合的結合に利用することができる。そのためポリアクリロニトリルは、不活性なナノ粒子およびマイクロ粒子用の基剤として、発光色素用の最適な包埋用基材である。

#### 【0018】

さらに、ポリアクリロニトリル共重合体またはポリアクリロニトリルとの混合ポリマー、すなわちアクリロニトリルと別の1以上のモノマーを含むポリマー、詳細には少なくとも50重量%、好ましくは少なくとも70重量%、特に好ましくは少なくとも90重量%のPANを含むポリアクリロニトリル共重合体または混合ポリマーを用いることも可能である。共重合体は、ポリマー鎖にPANおよび共重合用モノマーを含む。混合ポリマーは、1つのポリマー鎖にPANまたはPAN共重合体成分を含み、別のポリマー鎖に少なくとも1種類の非PAN成分を含む。共重合体および混合ポリマーに好適な別のモノマーは、親水性基および／または反応性基、例えばアクリル酸、アクリルアミン類およびアクリル酸エステル類などを有するモノマー、例えばポリエチレングリコールアクリル酸エステル類またはそれらの混合物である。この場合、親水性基を好ましくは粒子の表面上で濃縮する。その後、表面上の親水性基および／または反応性基を用いて、生体分子または発光指示体分子などの結合相手をカップリングさせることができる。さらにこれらの基は、粒子凝集の防止にも寄与し得る。

## 【0019】

ポリアクリロニトリル（PAN）に基づく発光性のマイクロ粒子およびナノ粒子は各種方法で製造することができる。

## 【0020】

A. ポリマー溶媒と混和性であるが、溶解度を低下させることで発光色素を有するポリマーを沈殿させる水、NaCl溶液などの水溶液その他の液体を制御下に滴下することで、例えばジメチルホルムアミドなどの有機溶媒（混合物）中のPANまたはPAN共重合体もしくは混合ポリマーの溶液から粒子を沈殿させる方法。ポリマー溶液は同時に、溶存発光色素を含む。この形態の方法は特に簡単であることから好ましい。

## 【0021】

B. ポリマー溶媒と混和性であるが、ポリマーの沈殿を引き起こす水、NaCl溶液などの水溶液その他の液体を制御下に滴下することで、例えばジメチルホルムアミドなどの有機溶媒（混合物）中のPANまたはPAN共重合体もしくは混合ポリマーの溶液から粒子を沈殿させる方法。このポリマー溶液は溶存発光色素を含まない。その後、発光色素を拡散によって粒子中に導入する。

## 【0022】

C. 例えば水またはエタノール中に発光色素を含むジメチルホルムアミドなどの有機溶媒（混合物）中のPANまたはPAN共重合体もしくは混合ポリマーの溶液を噴霧し、溶媒を蒸発させることで粒子を製造する方法。

## 【0023】

いずれのプロトコールにおいても、特に溶液中のポリマーの割合を変えることで粒径を調節することができる。ポリマーの割合を低下させると粒径も低下する。

## 【0024】

発光性のマイクロ粒子およびナノ粒子を製造および単離した後、例えば、濃水酸化ナトリウム溶液などの塩基中で表面に結合したニトリル基をケン化することで、表面を反応性カルボキシル基によって活性化することができる。2つの理由から、カルボキシル基が必要である。第1に、そうすることで、（pH-）緩衝系

で安定な分散液を製造することができ、第2に生体分子および発光指示体を表面に共有結合的に結合させることができる。

【0025】

表面を反応性基で修飾した本発明の粒子を用いて、発光指示体および／または生体分子を共有結合的にカップリングさせることができる。発光指示体は、粒子基材に含まれるものと同様の化合物であることができる。含まれている発光性化合物とは対照的に、表面にカップリングした発光指示体は環境と接触することから、環境化学パラメータに作用することができる。このように修飾された粒子を、内部参照での指示体として用いることができる。別法としてあるいは追加の方法として、毒素、ホルモン、ホルモン受容体、ペプチド、蛋白、レクチン、オリゴヌクレオチド、核酸、抗体、抗原、ウィルスおよび細菌などの生体分子を粒子表面にカップリングさせることも可能である。カップリングは、例えば二官能性リンカー分子を使用するなど、公知の方法によって行う。

【0026】

さらに、例えば分析物の診断測定などの蛍光アッセイで発光強度シグナルを参照するための標準として、上記粒子を用いることができる。

【0027】

ミクロ粒子およびナノ粒子は一方では、表面に結合したあるいは環境中に存在する発光指示体の発光強度を位相シグナルまたは時間依存性パラメータに変換するための発光標準として用いることができ（例えば、WO 99/06821号（Klimant）に記載の方法に従って、固相に発光指示体とともに粒子を固定化して、光学発光センサーの発光強度シグナルを参照するため）、他方では生体分子の高感度検出または測定用の発光マーカーとして用いることができる。

【0028】

従って本発明は、異なる減衰時間を有する2種類の異なる発光色素を用いる生化学的または化学的パラメータの発光測定方法に関するものでもあり、得られる発光応答の時間または位相特性を用いて前記パラメータ測定のための参照パラメータを得るものであり、第1の発光色素は、少なくとも発光強度に関して前記パラメータに対応するものであり、第2の色素は少なくとも発光強度および発光減

(14)

特表2003-504506

衰時間に関して前記パラメータには実質的に対応しないものであり、その方法は、第2の発光色素を本発明の粒子の形で用いることを特徴とする。使用される参照パラメータは好ましくは、発光シグナルの合計強度に依存しない2つの発光強度の割合の比である。代替パラメータとして使用可能な参照パラメータは、第2の発光色素の場合と比較した第1の発光色素の発光応答の位相シフトである。さらに参照パラメータは、第1の発光色素のシグナルおよび第2の発光色素の遅延参照シグナルとの合成シグナルの位相シフト測定値とすることもできる。この方法およびその方法を行うための装置に関する詳細については、WO 99/06821を参照されたい。

## 【0029】

以下の実施例は本発明を説明することを目的としたものである。

## 【0030】

実施例実施例1

ポリアクリルニトリルおよび [ルテニウム (II) -トリス-4, 7-ジフェニル-1, 10-フェナントロリン]<sup>2+</sup> からの発光性ナノ粒子の製造

n-ポリアクリロニトリル (Polysciences Inc., MW 150000) 1 g を、ルテニウム (II) -トリス-4, 7-ジフェニル-1, 10-フェナントロリン過塩素酸塩 10 mg とともに、ジメチルホルムアミド (DMF) 100 mL に溶かし、1リットルのガラス製ビーカーに導入する。この溶液に絶えず攪拌しながら H<sub>2</sub>O 400 mL をゆっくり滴下すると、溶液にわずかな濁りが生じる。その後、同様に絶えず攪拌しながら濃度5%の塩化ナトリウム溶液 10 mL を加えると、綿状沈殿が生じ、それは一晩でビーカーの底に沈殿する。この沈殿は色素全量を含有し、遠心によって分離し、次に濃度0.5%のNaCl溶液 250 mL で3回洗浄する。次の工程で、沈殿をエタノール 200 mL で洗浄して、表面に吸着された発光色素を完全に洗い落とす。遠心によって、沈殿からエタノールを除去する。その後、濃度0.05%のNaCl溶液での最後の洗浄工程を行う。ナノ粒子からなる沈殿を回収し、H<sub>2</sub>O 50 mL に取り上げる。

## 【0031】



実施例 2

ポリアクリルニトリルおよび [ルテニウム (I I) - トリス-1, 10-フェナントロリン] <sup>2+</sup> からのリン光性ナノ粒子の製造

n-ポリアクリロニトリル 1 g を、ルテニウム (I I) - トリス-1, 10-フェナントロリンヘキサフルオロリン酸塩 10 mg とともに、ジメチルホルムアミド 100 mL に溶かし、1 リットルのガラス製ビーカーに導入する。この溶液に、絶えず攪拌しながら  $H_2O$  400 mL をゆっくり滴下すると、溶液にわずかな濁りが生じる。その後、同様に絶えず攪拌しながら濃度 5 % の塩化ナトリウム溶液 10 mL を加えると沈殿が生じ、それは一晩でビーカーの底に沈殿する。この沈殿は使用した色素の約 90 % を含有し、遠心によって分離し、次に濃度 0.5 % の NaCl 溶液 250 mL で 3 回洗浄する。次の工程で、沈殿をエタノール 200 mL で洗浄して、表面に吸着された発光色素を完全に洗い落とす。遠心によって、沈殿からエタノールを除去する。その後、濃度 0.05 % の NaCl 溶液での最後の洗浄工程を行う。沈殿 (ナノ粒子) を回収し、 $H_2O$  50 mL に取り上げる。

【0032】

実施例 3

発光性ナノ粒子表面のカルボキシル化

ポリアクリロニトリル 200 mg の固体含有量を有する実施例 1 または 2 からの粒子懸濁液 10 mL を、濃度 5 % の NaOH 溶液 50 mL に取る。粒子沈殿および懸濁液を、激しく攪拌しながら 75 °C で 45 分間加熱する。強いアンモニア臭が、表面にあるニトリル基の加水分解を示す。濁った溶液が透明になった後、HCl を加えることで水酸化ナトリウム溶液を中和し、pH 3 に調節する。それによって再度、表面がカルボキシル化された粒子が沈殿し、それを遠心によって回収することができる。それを最後に pH 3 の緩衝液 50 mL で洗浄し、遠心によって回収し、蒸留水 10 mL に取り上げる。

【0033】

けん化は、8 % NaOH 中、25 °C で 24 時間にわたって同様に行うこともできる。

## 【0034】

実施例4

90%ポリアクリロニトリルと10%ポリアクリル酸との共重合体および[ルテニウム(II)ートリス-4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン]<sup>2+</sup>からなるナノ粒子

自動合成したアクリロニトリル/アクリル酸10:1共重合体2gおよびトリメチルシリルプロパンスルホン酸塩としての[ルテニウム(II)ートリス-4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン]<sup>2+</sup>(Ru(dpphen)<sub>3</sub>TMS<sub>2</sub>)40mgをDMF400gに溶かす。攪拌しながら10<sup>-3</sup>NのNaOH 1リットルを滴下し、水を加えて2リットルとする。得られる透明懸濁液を0.1NのHClでpH3に調節し、沈殿を遠心によって回収する。遠心沈殿を各回水1.8リットルで3回洗浄し、超音波によって50mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200mLに再度懸濁させる。透明懸濁液を20分間にわたって約80℃まで加熱し、冷却後、HClを加えることで再度pH3に調節し、遠心によって回収し、超音波によって50mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200mLに再度懸濁させる。

## 【0035】

実施例5

95%ポリアクリロニトリルと5%ポリアクリル酸との共重合体および[Ru(dpphen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>を含むナノ粒子

アクリロニトリル/アクリル酸20:1共重合体2gおよびRu(dpphen)<sub>3</sub>TMS<sub>2</sub>40mgをDMF400gに溶かす。攪拌しながら10<sup>-3</sup>N NaOH 1リットルを滴下し、水を加えて2リットルとする。得られる透明懸濁液を0.1N HClでpH3に調節し、沈殿を遠心によって回収する。遠心沈殿を各回水1.8リットルで3回洗浄し、超音波によって50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200mLに再度懸濁させる。透明懸濁液を20分間にわたって約80℃まで加熱し、冷却後、HClを加えることで再度pH3に調節し、遠心によって回収し、超音波によって50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200mLに再度懸濁させる。

(17)

特表2003-504506

## 【0036】

実施例 6

99. 5%ポリアクリロニトリルと0.5%ポリアクリルアミンとの共重合体  
および  $[Ru(dpphen)_3]^{2+}$  からなるナノ粒子

アクリロニトリル／3-アミノプロピルアクリルアミド-200:1共重合体  
0.5gおよび  $Ru(dpphen)_3TMS_2$  10mgをDMF100gに  
溶かす。攪拌しながら  $10^{-3}N$  HCl 0.5リットルを滴下し、水を加え  
て1リットルとする。得られる透明懸濁液を0.1N NaOHでpH9に調節  
し、沈殿を遠心によって回収する。遠心沈殿を各回水1リットルで3回洗浄し、  
超音波によって水50mLに再度懸濁させる。懸濁液を20分間にわたって約8  
0℃まで加熱し、冷却後、水で2回洗浄し、再懸濁させる。

## 【0037】

実施例 7

90%ポリアクリロニトリルと5%ポリアクリル酸と5%ポリエチレングリコ  
ールモノエチルエーテルアクリレートとの共重合体および  $[Ru(dpphen)_3]^{2+}$  からなるナノ粒子

アクリロニトリル／アクリル酸／ポリエチレングリコールモノメチルエーテル  
アクリレート20:1:1共重合体0.5gおよび  $Ru(dpphen)_3TMS_2$  5mgをDMF200gに溶かす。攪拌しながら  $10^{-3}N$  NaOH  
1リットルを滴下する。得られる透明懸濁液を0.1N HClでpH3に調  
節し、沈殿を遠心によって回収する。遠心沈殿を各回水1リットルで3回洗浄し  
、超音波によって100mM  $Na_2HPO_4$  1リットルに再度懸濁させる。  
HClを加えることで透明懸濁液をpH3に調節し、遠心によって回収し、超音  
波によって100mM  $Na_2HPO_4$  200mLに再度懸濁させる。透明懸  
濁液を20分間にわたって約80℃まで加熱し、冷却後、HClを加えることで  
再度pH3に調節し、遠心によって回収し、超音波によって50mM  $Na_2HPO_4$   
200mLに再度懸濁させる。

## 【0038】

実施例 8

(18)

特表2003-504506

85%ポリアクリロニトリルと5%ポリアクリル酸と10%ポリスルホアクリレートとの共重合体および  $[Ru(dpphen)_3]^{2+}$  からなるナノ粒子  
 アクリロニトリル／アクリル酸／スルホプロピルアクリレート20：1：2共重合体0.5gおよび  $Ru(dpphen)_3Cl_2$  50mgをDMF100gに溶かす。攪拌しながら  $10^{-3}N$  NaOH 0.5リットルを滴下する。得られる透明懸濁液を0.1N HClでpH3に調節し、沈殿を遠心によって回収する。遠心沈殿を各回水1リットルで3回洗浄し、超音波によって50mM  $Na_2HPO_4$  100mLに再度懸濁させる。透明懸濁液を20分間にわたって約80℃まで加熱し、冷却後、HClを加えることでpH3に調節し、遠心によって回収し、超音波によって50mM  $Na_2HPO_4$  100mLに再度懸濁させる。

【0039】

実施例9

ポリアクリロニトリルまたはポリアクリロニトリル共重合体に基づく発光性粒子の特性決定

平均直径20～100nmを有し、発光色素ルテニウム（II）ートリス-4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリンを含む列挙した粒子について、20℃の20mMリン酸緩衝液（pH7）中で測定を行った。ナノ粒子をサンプルに分散させた。結果を以下の表1に示してある。

【0040】

## 【表1】

ポリアクリロニトリル粒子に基づく各種リン光性ナノ粒子の特性決定

（ここに挙げた粒子の直径は20～100nmであり、いずれの場合も色素はルテニウム（II）ートリス-4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン錯体である。測定はいずれも、20℃の20mMリン酸緩衝液（pH7）中で行った。ナノ粒子をサンプル中に分散させた。）

(19)

特表2003-504506

| センサー         | 基礎モノマ<br>(=アクリロニ<br>トリル)<br>[重量%] | モノマー  | モノマー<br>[重量%] | 空気飽和<br>相対リ<br>ン光強<br>度<br>I | 減衰<br>時間<br>[μs] | N <sub>2</sub> 飽和<br>減衰時<br>間<br>[μs] | 酸素消<br>光 (0 ~<br>200hPa<br>の pO <sub>2</sub> で<br>の減衰<br>時間短<br>縮)<br>% |
|--------------|-----------------------------------|-------|---------------|------------------------------|------------------|---------------------------------------|---|
| 水に溶かし<br>た色素 | -                                 | -     | -             | 12                           | 0.90             | 4.40                                  | 85  |
| 1 (実施例 1)    | 100.0                             | -     | 0.0           | 23.81                        | 5.69             | 6.20                                  | 8.2   |
| 2            | 90.0                              | アクリル酸 | 10.0          | 26.00                        | 6.10             | 6.36                                  | 4.1   |
| 3            | 87.0                              | アクリル酸 | 13.0          | 19.61                        | 5.55             | 6.17                                  | 10.0  |
| 4            | 76.9                              | アクリル酸 | 23.1          | 18.07                        | 5.89             | 5.91                                  | 0.3   |
| 5 (実施例 5)    | 95.0                              | アクリル酸 | 5.0           | 15.24                        | 5.78             | 6.11                                  | 5.4   |

(20)

特表2003-504506

|            |      |   |             |       |      |      |      |
|------------|------|---|-------------|-------|------|------|------|
| 6          | 95.0 | エチレング リコールモノエチルエーテルアクリレート                                     | 5.0         | 19.36 | 6.01 | 6.24 | 3.7  |
| 7 (実施例 7)  | 90.0 | アクリル酸,<br>エチレング リコールモノエチルエーテルアクリレート                           | 5.0,<br>5.0 | 17.23 | 5.38 | 5.94 | 9.4  |
| 8          | 83.4 | アクリル酸,<br>エチレング リコールモノエチルエーテルアクリレート                           | 8.3,<br>8.3 | 19.46 | 6.00 | 6.16 | 2.6  |
| 9 (実施例 8)  | 87.0 | アクリル酸,<br>アクリロルボン酸  | 4.3,<br>8.7 | 16.05 | 5.36 | 5.98 | 10.4 |
| 10         | 95.0 | 1 級アクリルアミン<br>(エステル, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ ) | 5.0         | 25.11 | 5.59 | 5.96 | 6.2  |
| 11         | 90.0 | 1 級アクリルアミン<br>(エステル, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ ) | 10.0        | 18.64 | 5.75 | 5.82 | 1.2  |
| 12 (実施例 6) | 99.5 | 1 級アクリルアミン<br>(アミン, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ )  | 0.5         | 16.52 | 5.27 | 5.90 | 10.7 |

(21)

特表2003-504506

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Jonal Application No  
PCT/EP 00/06832

|  |   |  |
|--|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 G01N33/58 G01N33/96  |   |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 G01N   |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| X  | WO 99 05821 A (KLIMANT INGO)<br>11 February 1999 (1999-02-11)<br>cited in the application<br>page 8, line 18 - page 9, line 22<br>page 14, line 5 - line 17 | 1-7,<br>11-13,22   |
| X  | WO 95 14928 A (SYNTEX INC)<br>1 June 1995 (1995-06-01)<br><br>claims 1,3  | 1-5,<br>8-10,14,<br>15,<br>19-21,23                                  |
| X  | GB 2 132 348 A (UNIV VIRGINIA)<br>4 July 1984 (1984-07-04)<br>claims 5,9,11-14  | 1-5  |
| -/-  |   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.   |   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.   |   |  |
| * Special categories of cited documents :<br>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>*Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>*Z* document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>20 December 2000  |   | Date of mailing of the international search report<br><br>23/01/2001 |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3018   |   | Authorized officer<br><br>Hart-Davis, J                              |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

(22)

特表2003-504506

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.  
PCT/EP 00/06832

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                             |
|---|---|-----------------------------|
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.       |
| X   | PATENT ABSTRACTS OF JAPAN<br>vol. OII, no. 379 (C-463),<br>10 December 1987 (1987-12-10)<br>& JP 62 148580 A (TOAGOSEI CHEM IND CO<br>LTD; OTHERS: OI), 2 July 1987 (1987-07-02)<br>abstract  | 1, 2,<br>8-10, 14,<br>19-21 |
| P, X  | HUBER, CHRISTIAN ET AL: "Optical sensor<br>for seawater salinity"<br>FRESENIUS' J. ANAL. CHEM. (2000),<br>368(2-3), 196-202 ,<br>XP000974975<br>the whole document  | 1-27                        |
| P, X  | LIEBSCH, GREGOR ET AL: "Luminescence<br>lifetime temperature sensing based on sol<br>-gels and poly ( acrylonitrile )s dyed<br>with ruthenium metal-ligand complexes"<br>ADV. MATER. (WEINHEIM, GER.) (1999),<br>11(15), 1296-1299 ,<br>XP000971460<br>the whole document | 1-5, 8-24                   |
| A   | WQ 96 21154 A (IGEN INC)<br>11 July 1996 (1996-07-11)<br>page 16, line 9 -page 17, line 22;<br>examples A, B  | 1-5                         |

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)



(23)

特表2003-504506

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06832

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|---------------------|---|--|
| WO 9906821 A                              | 11-02-1999          | DE 19829657 A<br>EP 1000345 A   | 04-02-1999<br>17-05-2000   |
| WO 9514928 A                              | 01-06-1995          | US 5578498 A<br>CA 2177143 A<br>EP 0730738 A<br>JP 9505888 T<br>US 5536834 A<br>US 5811311 A<br>US 5780646 A  | 26-11-1996<br>01-06-1995<br>11-09-1996<br>10-06-1997<br>16-07-1996<br>22-09-1998<br>14-07-1998 |
| GB 2132348 A                              | 04-07-1984          | CA 1261717 A<br>DE 3346810 A<br>FR 2538550 A<br>JP 1933506 C<br>JP 6043963 B<br>JP 59170748 A<br>US 5030420 A | 26-09-1989<br>26-07-1984<br>29-06-1984<br>26-05-1995<br>08-06-1994<br>27-09-1984<br>09-07-1991 |
| JP 62148580 A                             | 02-07-1987          | JP 5064671 B  | 16-09-1993   |
| WO 9621154 A                              | 11-07-1996          | AU 4756296 A  | 24-07-1996   |

(24)

特表2003-504506

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I           | テーマコード (参考) |
|--------------------------|-------|---------------|-------------|
| B 0 1 D 9/02             | 6 0 8 | B 0 1 D 9/02  | 6 0 8 Z     |
|                          | 6 1 5 |               | 6 1 5 A     |
|                          |       |               | 6 1 5 Z     |
|                          | 6 2 0 |               | 6 2 0       |
|                          | 6 2 5 |               | 6 2 5 Z     |
| B 0 1 J 19/00            |       | B 0 1 J 19/00 | N           |
| // C 0 7 F 13/00         |       | C 0 7 F 13/00 | Z           |
| 15/00                    |       | 15/00         | A           |
|                          |       |               | F           |

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, C A, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K E, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, R U, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

【公報種別】 特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
【部門区分】 第 3 部門第 3 区分  
【発行日】 平成 19 年 6 月 7 日 (2007.6.7)

【公表番号】 特表 2003-504506(P2003-504506A)  
【公表日】 平成 15 年 2 月 4 日 (2003.2.4)  
【出願番号】 特願 2001-510815(P2001-510815)  
【国際特許分類】

|         |       |           |
|---------|-------|-----------|
| C 0 9 K | 11/06 | (2006.01) |
| B 0 1 D | 1/18  | (2006.01) |
| B 0 1 D | 9/02  | (2006.01) |
| B 0 1 J | 19/00 | (2006.01) |
| C 0 7 F | 13/00 | (2006.01) |
| C 0 7 F | 15/00 | (2006.01) |

【F I】

|         |       |         |
|---------|-------|---------|
| C 0 9 K | 11/06 |         |
| B 0 1 D | 1/18  |         |
| B 0 1 D | 9/02  | 6 0 1 L |
| B 0 1 D | 9/02  | 6 0 2 E |
| B 0 1 D | 9/02  | 6 0 4   |
| B 0 1 D | 9/02  | 6 0 8 Z |
| B 0 1 D | 9/02  | 6 1 5 A |
| B 0 1 D | 9/02  | 6 1 5 Z |
| B 0 1 D | 9/02  | 6 2 0   |
| B 0 1 D | 9/02  | 6 2 5 Z |
| B 0 1 J | 19/00 | N       |
| C 0 7 F | 13/00 | Z       |
| C 0 7 F | 15/00 | A       |
| C 0 7 F | 15/00 | F       |

【手続補正書】

【提出日】 平成 19 年 4 月 12 日 (2007.4.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発光性ミクロ粒子またはナノ粒子であって、長い発光寿命を有する発光物質を含有し、該発光物質が周囲の化学的、生化学的および気体のパラメータから実質的に遮断されていることを特徴とする、上記粒子。

【請求項 2】

前記発光物質が、中心原子としてのルテニウム (I I)、オスミウム (I I)、レニウム (I)、イリジウム (I I I)、白金 (I I) およびパラジウム (I I) の金属/配位子錯体である、請求項 1 に記載の粒子。

【請求項 3】

前記発光物質が、配位子としての 2, 2'-ビピリジン、ビピラジン、フェナントロリン、ターピリジルまたはそれらの誘導体などの 2 座または 3 座のポリピリジル配位子との錯体である、請求項 2 に記載の粒子。

## 【請求項 4】

前記発光物質が、2, 2'-ビピリジルおよび1, 10-フェナントロリンの誘導体などの別のジイミン配位子とRe (I) とのカルボニル錯体である、請求項1に記載の粒子。

## 【請求項 5】

発光性化合物が、中心原子としてのPt (II) およびPd (II) のポルフィリン錯体である、請求項1に記載の粒子。

## 【請求項 6】

低い吸水性および／または低い気体透過性を特徴とする有機ポリマーを含有する、請求項1～5のいずれか1項に記載の粒子。

## 【請求項 7】

ポリアクリロニトリル、ポリ(メタ)アクリル共重合体、ポリ塩化ビニルまたはポリ塩化ビニリデンおよびそれらの共重合体からなる群からの有機ポリマーを含む、請求項6に記載の粒子。

## 【請求項 8】

実質的に微細孔が存在しないガラスを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の粒子。

## 【請求項 9】

ゾル／ゲル法に従って製造されたガラスを含む、請求項8に記載の粒子。

## 【請求項 10】

発光指示体および／または生体分子の共有結合的カップリングを可能とするアミノ基、エポキシ基、水酸基、チオール基および／またはカルボキシル基などの反応性基によって表面が修飾された、請求項1～9のいずれか1項に記載の粒子。

## 【請求項 11】

請求項6又は7に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の製造方法であって、ポリマー溶媒と混和性であるが、該ポリマーの溶解度を低下させる液体を滴下することで、発光性化合物が可溶性形態で存在するポリマー溶液から前記粒子を沈殿させることを特徴とする、上記方法。

## 【請求項 12】

水または水溶液を滴下することで、発光性化合物が可溶性形態で存在するジメチルホルムアミドおよびポリアクリロニトリルまたはポリアクリロニトリル共重合体を含む溶液から前記粒子を沈殿させる、請求項11に記載の方法。

## 【請求項 13】

請求項6又は7に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の製造方法であって、発光性化合物を、溶媒(混合物)からの拡散によって、前もって製造した粒子に組み込むことを特徴とする、上記方法。

## 【請求項 14】

請求項6又は7に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の製造方法であって、前記粒子を、発光性化合物が可溶性形態で存在するポリマー溶液を噴霧し、溶媒を蒸発させることによって形成することを特徴とする、上記方法。

## 【請求項 15】

毒素、ホルモン、ホルモン受容体、ペプチド、蛋白質、レクチン、オリゴヌクレオチド、核酸、抗体、抗原、ウイルスおよび細菌からなる群からの生体分子の標識付けおよび発光検出における請求項1～10のいずれか1項に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の使用。

## 【請求項 16】

蛍光アッセイでの蛍光強度シグナルの参照標準としての請求項1～10のいずれか1項に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の使用。

## 【請求項 17】

光学発光センサーの発光強度シグナルを参照するための請求項1～10のいずれか1項

に記載の発光性マイクロ粒子およびナノ粒子の使用であって、前記粒子が発光指示体とともに固相に固定化されていることを特徴とする、上記使用。

【請求項 18】

異なる寿命を有する 2 種類の異なる発光色素を用いる生化学的または化学的パラメータの発光測定方法であって、得られる発光応答の時間または位相特性を用いて前記パラメータ測定のための参照パラメータを得るものであり、第 1 の発光色素が少なくとも発光強度に関して前記パラメータに対応しており、第 2 の発光色素が少なくとも発光強度および発光寿命に関して前記パラメータに対応しておらず、その際、第 2 の発光色素が請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の粒子の形で用いられることを特徴とする、上記方法。